

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-199460

(43)Date of publication of application : 15.07.2003

(51)Int.Cl.

A01K 67/027  
G01N 33/15  
G01N 33/50  
G01N 33/58  
// C12N 15/09

(21)Application number : 2002-001229

(71)Applicant : SHOJI MIKIO  
IKEDA MASAKI  
YAMADA SHUICHI

(22)Date of filing : 08.01.2002

(72)Inventor : SHOJI MIKIO  
IKEDA MASAKI  
YAMADA SHUICHI

## (54) TRANSGENIC MOUSE OF PARKINSON'S DISEASE MODEL

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a transgenic mouse of Parkinson's disease model, in which a double-mutant gene of  $\alpha$ -synuclein gene causing Parkinson's disease is introduced, reproduces an appearance of Levy bodies and behavior abnormality, and lowers of intracerebral dopamine.

SOLUTION: This transgenic mouse of Parkinson's disease model reproducing the appearance of Levy bodies, behavioral abnormality and lowering of intracerebral dopamine is obtained by forming double-mutant gene of  $\alpha$ -synuclein gene and introducing the variant gene into a mouse.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-199460

(P2003-199460A)

(43) 公開日 平成15年7月15日 (2003.7.15)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード <sup>*</sup> (参考)
A 0 1 K 67/027	Z N A	A 0 1 K 67/027	Z N A 2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z 4 B 0 2 4
33/50		33/50	Z
33/58		33/58	A
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
審査請求 有 請求項の数11 O L (全 12 頁)			

(21) 出願番号 特願2002-1229 (P2002-1229)

(22) 出願日 平成14年1月8日 (2002.1.8)

(71) 出願人 502010376

東海林 幹夫

岡山県岡山市門田屋敷2-2-1

(71) 出願人 502010387

池田 将樹

群馬県前橋市上小出町1-23-9

(71) 出願人 502010398

山田 秀一

京都府京都市左京区聖護院川原町53

(74) 代理人 100089244

弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パーキンソン病モデルトランスジェニックマウス

(57) 【要約】

【課題】 パーキンソン病原因遺伝子である $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の二重変異型遺伝子が導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウスを提供することを課題とする。

【解決手段】  $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の二重変異型遺伝子を構築し、同変異型遺伝子をマウスに導入することによって、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウスを得る。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第一の変異、及び、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第二の変異を有する $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウス。

【請求項2】 前記 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAがヒト由来である、請求項1に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項3】 前記プロモーターがThy-1プロモーターである、請求項1又は2に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項4】 前記第一の変異は、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がスレオニン残基に置換する変異である、請求項1～3のいずれかに記載のトランスジェニックマウス。

【請求項5】 前記第二の変異は、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がプロリン残基に置換する変異である、請求項1～4のいずれかに記載のトランスジェニックマウス。

【請求項6】 さらに、遺伝子マーカーを導入されている、請求項1～5のいずれかに記載のトランスジェニックマウス。

【請求項7】 前記遺伝子マーカーは緑色蛍光タンパク質である、請求項6に記載のトランスジェニックマウス。

【請求項8】 請求項1～7のいずれかに記載のトランスジェニックマウスを用いる、パーキンソン病治療薬のスクリーニング方法。

【請求項9】 前記パーキンソン病治療薬が、Lドーパ補充療法に使用される、請求項8に記載のスクリーニング方法。

【請求項10】 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第一の変異、及び、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第二の変異を有する $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAが、強力なプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを構築し、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーをマウスの受精卵に導入し、得られた受精卵を偽妊娠マウスに移植し、マウスを飼育し、前記遺伝子マーカーの発現産物を指標として、生まれた仔マウスから前記組換えDNAを有する仔マウスを選択する、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキン

ソン病モデルトランスジェニックマウスの作製方法。

【請求項11】 前記 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAがヒト由来である、請求項10に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、パーキンソン病モデルトランスジェニックマウスに関し、詳しくは、パーキンソン病原因遺伝子である $\alpha$ -シヌクレイン( $\alpha$ -synuclein)遺伝子の二重変異型遺伝子を導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウス、同トランスジェニックマウスの効率的な選択方法、及び、同トランスジェニックマウスを用いたパーキンソン病治療薬のスクリーニング方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】パーキンソン病(Parkinson's disease: PD)は成人・高齢者にみられる神経変性疾患として最も頻度の高いものの一つである。主として運動機能が障害され、振戦、筋固縮、無動、姿勢反射障害などの症状が出現する。その責任病変は中脳黒質のドーパミン産生神経細胞の変性・消失とされ、その他に青斑核、迷走神経核などにも神経細胞の消失がみとめられる。これらの障害による中脳-基底核系の選択的ドーパミン低下はその前駆体であるLドーパを経口投与することにより、著明な症状の改善がみられることから、現在はパーキンソン病の治療としてLドーパおよびLドーパ受容体アゴニストが広く用いられている。しかし、症状の進行はそれにもかかわらず次第に進行し、これらの薬効も減弱するため、数年から十数年の間には患者は寝たきり状態となり、死亡する。したがって、パーキンソン病の根本的な原因の解明と治療法の確立が早急に望まれている。

【0003】黒質、青斑核、迷走神経核などにおける残存ニューロンにおいて、細胞内に出現する特異的封入体がレビー小体である。脳幹病変に加え、大脳皮質にもレビー小体が出現する疾患が、レビー小体を伴う痴呆症(Dementia with Lewy bodies:DLB)であり、痴呆性変性疾患の中ではアルツハイマー病について第二番目に多い疾患である。

【0004】パーキンソン病の大多数は孤発例であるが、ごく一部に常染色体優性遺伝をとる家系が存在し、1997年にPolymeropoulosらはイタリアとギリシャの家族性パーキンソン病家系の連鎖解析から、原因遺伝子を染色体第4番長腕上の $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子と同定し、ミスセンス変異(A53T)を確認した(Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alp

ha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science 1997 Jun 27;276(5321):2045-7)。さらに翌年にはドイツ家系からミスセンス変異 (A30P) が確認され (Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen J T, Schols L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. Nat Genet. 1998 Feb;18(2):106-8.)、家族性パーキンソン病の原因遺伝子としてはじめに同定された。その後、抗 $\alpha$ -シヌクレイン抗体を用いた生化学的検討や免疫組織学的検討によって孤発例のパーキンソン病やDLBのレビー小体は、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質が蓄積してできることが明らかになり、パーキンソン病の原因としての $\alpha$ -シヌクレインタンパク質蓄積の重要性が明らかとなってきた。

【0005】一方、新しい世紀を迎え、ポストゲノムプロジェクト時代には個々の遺伝子機能を個体レベルで解析することがますます重要になっている。マウスは我々ヒトと同じ哺乳類であり、遺伝子配列データがヒトと共通する部分も多いため、生命科学には欠かせない実験動物である。また近年発達し続ける遺伝子工学により遺伝子導入(トランスジェニック)や標的遺伝子置換(ジーンターゲッティング)を行った個体を作製することが可能となり、遺伝子機能の解析ばかりでなく、原因遺伝子を用いた疾患モデル動物を開発して、疾患に対する効果的な新薬開発の需要は今後さらに増加するものと考えられる。

【0006】これまでに、パーキンソン病のモデルマウスとして、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質の野生型、変異型を過剰発現するトランスジェニックマウスが報告されたが、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するトランスジェニックマウスについては未だ報告されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記観点からなされたものであり、パーキンソン病原因遺伝子である $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の二重変異型遺伝子が導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウス、同トランスジェニックマウスの効率的な選択方法、及び、同トランスジェニックマウスを用いたパーキンソン病治療薬のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の二重変異型遺伝子を構築し、同変異型遺伝子をマウスに導入することによって、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するトランスジェニックマウスを得ることに成功した。また、本

願発明者らは、同変異型遺伝子と遺伝子マーカーを共導入 (co-injection) することによって、効率的に前記トランスジェニックマウスを選択する方法を確立することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0009】詳しくは、本願発明者らは1)より凝集性の高い二重変異型 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードする二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を構築し、2)高発現系を獲得可能なプロモーターを用いて、同遺伝子を発現させ、同タンパク質をマウスの脳に発現させることに成功し、パーキンソン病モデルトランスジェニックマウスを得るに至った。本願発明者らは、さらに、前記プロモーター及び二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子に加え、3)緑色蛍光タンパク質 (Green fluorescent protein) をマウスに共導入することによって大量に生まれたF0マウスから高発現系トランスジェニックマウスを効果的に迅速に選択する方法を確立することに成功した。

【0010】すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第一の変異、及び、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第二の変異を有する $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAがプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウス。

(2) 前記 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAがヒト由来である、(1)に記載のトランスジェニックマウス。

(3) 前記プロモーターがThy-1プロモーターである、(1)又は(2)に記載のトランスジェニックマウス。

(4) 前記第一の変異は、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がスレオニン残基に置換する変異である、(1)～(3)のいずれかに記載のトランスジェニックマウス。

(5) 前記第二の変異は、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がプロリン残基に置換する変異である、(1)～(4)のいずれかに記載のトランスジェニックマウス。

(6) さらに、遺伝子マーカーを導入されている、(1)～(5)のいずれかに記載のトランスジェニックマウス。

(7) 前記遺伝子マーカーは緑色蛍光タンパク質である、(6)に記載のトランスジェニックマウス。

(8) (1)～(7)のいずれかに記載のトランスジェニックマウスを用いる、パーキンソン病治療薬のスク

リーニング方法。

(9) 前記パーキンソン病治療薬が、L-ドーパ補充療法に使用される、(8)に記載のスクリーニング方法。

(10) 配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第一の変異、及び、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第二の変異を有する $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAが、強力なプロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを構築し、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーをマウスの受精卵に導入し、得られた受精卵を偽妊娠マウスに移植し、マウスを飼育し、前記遺伝子マーカーの発現産物を指標として、生まれた仔マウスから前記組換えDNAを有する仔マウスを選択する、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウスの作製方法。

(11) 前記 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAがヒト由来である、(10)に記載のトランスジェニックマウス。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明の二重変異型 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質を過剰に発現するトランスジェニックマウスはパーキンソン病におけるレビー小体形成と行動異常及びドーパミンの低下を再現するパーキンソン病の疾患動物モデルであり、SIY8713と名付けた。このモデル動物(SIY8713)は今後のパーキンソン病の原因解明、治療薬物開発に貴重な役割を果たすものである。

【0012】本発明の二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子は、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第一の変異、及び、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第二の変異を有する、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAである。二重変異を導入する $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子としては、二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が導入されているトランスジェニックマウスが、パーキンソン病におけるレビー小体形成と行動異常及びドーパミンの低下を再現するようなものであれば、どのような生物由来のものであってもよいが、好ましい一例として、ヒト由来のものが挙げられる。このようなDNAは、例えば、公知のヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子をコードするゲノムDNAを鋳型とし、 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質のアミノ酸番号30、及びアミノ酸番号53のアラニン残基をコードする $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の塩基を他のアミノ酸をコードするように置換したミスセンス変異導入プライマーを用いたPCRによって、得ることができる。以下の実施例に、このようなミスセンス導入操作に用いられる、ミスセンス変異

導入プライマーの一例を示す。また、本発明の二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子は化学合成によって得ることもできる。

【0013】前記第一の変異としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がスレオニン残基に置換する変異が好ましい。また、前記第二の変異としては、配列番号1に記載のアミノ酸配列のアミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基がプロリン残基に置換する変異が好ましい。

【0014】 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質は、種間、個体間でタンパク質の活性に影響しないアミノ酸残基においてアミノ酸の置換、挿入、欠失等の相違を有することがある。このようなアミノ酸の置換、挿入、欠失等を有する $\alpha$ -シヌクレインタンパク質における、配列番号1のアミノ酸番号30及び53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基は、当業者によって容易に特定され得る。

【0015】本発明のDNAは過剰発現されることが望ましい。過剰発現は、例えば、本発明のDNAが適当なベクター中のプロモーターの制御下に配置された組換えDNAによって行うことができる。本発明に用いられるプロモーターとしては、作製するトランスジェニックマウスの神経細胞における発現を特異的に強化するものが好ましい。好ましいプロモーターの一例として、マウス神経細胞における発現を特異的に強化するヒトThy-1プロモーターが挙げられる。

【0016】なお、本発明に用いられるPCR、プライマーの作製、ゲノムDNAの調製、クローニング、酵素処理等の方法は、当業者によく知られている通常の方法により行うことができる。

【0017】本発明のトランスジェニックマウスは、アミノ酸番号30のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第一の変異、及び、アミノ酸番号53のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸に置換する第二の変異を有する $\alpha$ -シヌクレインタンパク質をコードするDNAが、プロモーターの制御下に配置されている組換えDNAを導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウスである。

【0018】このようなトランスジェニックマウスは、具体的には、例えば、本発明の二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子が強力なプロモーターの制御下に配置されるように組換えDNAを構築し、得られた組換えDNAをマウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、生き残った受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、マウスを飼育し、生まれた仔マウスから前記組換えDNAを有する仔マウスを選択することによって得ることができる。生まれた仔マウスからの組換えDNAを有する仔マウスの選択は、例えば、マウス尾より抽出したゲノム

DNAを鋳型とし、 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の塩基配列の一部を有するプライマーを用いたPCRにて、前記組換えDNAの導入の有無を確認する方法により、行うことができる。

【0019】本発明のトランスジェニックマウスは、好ましくは、本発明の組換えDNAと共に、遺伝子マーカーを導入されているトランスジェニックマウスである。遺伝子マーカーの一例として、好ましくは、緑色蛍光タンパク質(GFP)が挙げられる。緑色蛍光タンパク質としては、本発明のトランスジェニックマウスが選択できるものであれば、野生型、変異型のうちのいずれを用いてもよい。

【0020】本発明の組換えDNAと共に、遺伝子マーカーを導入されているトランスジェニックマウスは、組換えDNAと共に、遺伝子マーカーをマウスの受精卵雄性前核にマイクロインジェクションし、生き残った受精卵を偽妊娠マウスの卵管に移植し、マウスを飼育し、生まれた仔マウスから前記組換えDNAを有する仔マウスを選択することによって得ることができる。生まれた仔マウスからの組換えDNA及び遺伝子マーカーを有する仔マウスの選択は、仔マウスに発現している遺伝子マーカーの発現産物を指標として、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーの導入の有無を確認する方法により、効率的に行うことができる。例えば、遺伝子マーカーとしてEGFPを用いた場合、生まれた仔マウスに紫外線を照射し、マウスの皮膚が発現したEGFPにより緑色の蛍光を発するものを選択することによって、前記組換えDNA及び遺伝子マーカーの導入の有無を確認する方法により、効率的にトランスジェニックマウスの選択を行うことができる。

【0021】本発明の組換えDNAを導入する受精卵は、雄マウスと雌マウスを交配することにより得ることができる。本発明の組換えDNAを受精卵に導入する方法としては、マイクロインジェクション法、レトロウィルス・ベクターによる方法、又は、胚性幹細胞を用いる方法等が挙げられるが、マイクロインジェクション法が好ましく挙げられる。なお、本発明に用いられる受精卵の培養、マイクロインジェクション、受精卵の移植等の方法は、当業者によく知られている通常の方法により行うことができる。

【0022】本願発明のトランスジェニックマウスが再現するレビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下は次のようにして確認することができる。レビー小体の出現は、トランスジェニックマウスから調製された脳切片を、抗 $\alpha$ -シヌクレイン抗体で反応させたものを、顕微鏡下で観察することにより、神経細胞における封入体として確認することができる。また、行動異常は、ローターロッド等を用いた行動実験により、運動機能を測定し、非トランスジェニックマウスとの比較をすることにより、非トランスジェニックマウスに比べ、低下した運動機能として確認することができる。脳内ドー

パミンの低下は、対照マウス及びトランスジェニックマウスから調製された脳各組織より、タンパク質を抽出し、含まれるドーパミンの量を比較することにより確認することができる。好ましくは、ドーパミンの低下は脳内線条体において確認される。

【0023】本願発明者らが作製し、継代に成功したSIY8713トランスジェニックマウスは、病理学的にはパーキンソン病にみられるレビー小体とレビー変性神経突起を再現するパーキンソン病の疾患モデル動物である。さらに、学習行動実験からSIY8713トランスジェニックマウスは運動機能の著明な低下が認められた。また、SIY8713トランスジェニックマウスはパーキンソン病の最も重要な変化であるドーパミンの低下も再現する。このことは、現在、パーキンソン病の治療法の標準となっているL-ドーパ補充療法の新たな治療薬開発にも有用であることを示している。これらの所見は、すなわち、本願発明者らの開発した二重変異型 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質(A30PとA53Tの二重変異)を高発現する本発明のトランスジェニックマウスはパーキンソン病の動物モデルとして疾患の発生機序を解明し、根本的治療法及び治療薬を開発するためのスクリーニング系として有用であることを示している。

【0024】具体的に、本願発明のトランスジェニックマウスをパーキンソン病治療薬のスクリーニング系として、例えば、次のように用いることができる。本願発明のトランスジェニックマウスを被験マウス群、及び、対照マウス群にわけ、被験マウス群に試験する治療薬を投与し、その後、被験マウス群、及び、対照マウス群のそれぞれから脳組織を調製し、レビー小体とレビー変性神経突起などの $\alpha$ -シヌクレイン蓄積による病理変化の改善やドーパミンの低下の改善を観察することにより、並びに、行動実験により、各群を比較し、治療薬の効果を検討し、パーキンソン病治療薬をスクリーニングすることができる。このような治療薬の例として、L-ドーパ補充療法の治療薬が好ましく挙げられる。

【0025】本願発明者らが開発した変異型トランスジェニックマウス脳において神経細胞内の変異型 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質の蓄積とレビー小体とレビー変性神経突起を認めた。さらに、マウスの行動実験により運動機能の著明な低下も確認された。さらに、基底核におけるドーパミンの選択的低下も再現された。これらの所見より本願発明者らの開発した二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン(A30P、A53T変異)を発現するトランスジェニックマウスはパーキンソン病の疾患モデルとして疾患の発生機序の検討と治療法の開発にきわめて有用である。SIY8713マウスは最も高発現なラインを365nmの紫外線照射を用いて容易にスクリーニングすることが可能であり、治療薬開発に向けた均一な表現系を有する迅速なマウスのスクリーニングにも有用である。

【0026】

【実施例】以下に、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は、その要旨をこえない限り、これらの実施例に限定されるものではない。

(1) 二重変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子導入ベクターの作製

二重変異型ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子を導入するDNAとして、マウス神経細胞に特異的に発現するヒトThy-1プロモーターを有するゲノムDNA (8.1kb)を用いた (Gordon JW, Chesa PG, Nishimura H, Retting WJ, Maccari JE, Endo T, Seravalli E, Seki T, Silver J. Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice. Cell 50: 445-452, 1987.)。このゲノムDNAのヒトThy-1遺伝子翻訳領域は開始コドン直前にHindIII配列(太字)とXbaI配列(下線)を含む人工的な変異配列を有している(図5)。

【0027】配列番号1に示されるヒト正常型 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質のアミノ酸番号30のアラニン残基をスレオニン残基に置換する変異(A30P変異)を導入するため、以下に示すヒト正常型 $\alpha$ -シヌクレインcDNAに変異を導入するためのミスセンス変異導入用プライマーを作製した。

【0028】ミスセンス変異プライマーA30P-フォワード: TGTGGCAGAAGCACCAGGA (配列番号4)

ミスセンス変異プライマーA30P-リバーズ: TCCTGGTGC TTCTGCCACA (配列番号5)

【0029】プラスミドブルースク립トII KS (ストラタジーン社)にクローニングしたヒト正常型 $\alpha$ -シヌクレイン cDNAを鋳型DNAとして、A30P-フォワードとM13Rのプライマーセット、並びにA30P-リバーズとM13Fのプライマーセットを用いてそれぞれ別々にPCRを行った。PCRは、94℃、1分; 54℃、1分; 72℃、1分を30サイクルの反応条件で行った。得られた両PCR産物を混合し、鋳型DNAとして、M13F/M13Rプライマーを用いて、PCRを行い、A30Pミスセンス変異 $\alpha$ -シヌクレイン cDNAクローンを得た。PCRは、94℃、1分; 54℃、1分; 72℃、1分を30サイクルの反応条件で行った。

【0030】次に、配列番号1に示されるヒト正常型 $\alpha$ -シヌクレインタンパク質のアミノ酸番号53のアラニン残基をプロリン残基に置換する変異(A53P変異)を導入するため、以下に示すミスセンス変異導入用プライマーを作製した。

【0031】ミスセンス変異プライマーA53T-フォワード: TGGTGTGACAACAGTGGCT (配列番号6)

ミスセンス変異プライマーA53P-リバーズ: AGCCACTG TTGTCACACCA (配列番号7)

【0032】A30Pミスセンス変異 $\alpha$ -シヌクレイン cDNAクローンを鋳型DNAとして、上記A53T-フォワード及びA53P-リバーズプライマーを用いて、A30P変異の導入の際と同様のPCR操作を行い、二重変異(A30P/A53T)を有する二重変異型 $\alpha$ -シヌクレインcDNAクローンを得た。この

cDNAクローンを、二重変異を有する $\alpha$ -シヌクレイン cDNA (450bp)断片をHindIIIにて予め切断したヒトThy-1ゲノムDNAに組み込み、ブルースク립トII KSにクローン化し、SalI/NotIにて切断し、二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子導入ベクター(phThy1- $\alpha$  SN (A30P/A53T))を作製した(図1)。

【0033】(2) 導入遺伝子マーカーの作製

発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来のコザック配列を含むEGFP (増幅緑色蛍光タンパク質) (Enhanced green fluorescent protein) cDNAの約730bpを可視遺伝子マーカーとして使用した。遺伝子マーカーは、pEGFP-Basic (クローンテックカンパニー) をテンプレートに用いて、PCRによってコザック配列を含むEGFPのcDNA両端にEcoRIリンカーを作製、pCAGGSベクター (Niwawa H, Yamamura K and Miyazaki J: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, Gene, 108, 193-199, 1991) のEcoRI 部位に、PCR産物を導入したプラスミドpCX-EGFPから、SalI-BamHI消化による約3Kb断片(CX-EGFP)を回収し、導入遺伝子マーカー(CX-EGFP)を得た。

【0034】(3) トランスジェニックマウスの作製  
トランスジェニックマウスは(1)で得られた二重変異型 $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子導入ベクターphThy1- $\alpha$  SN (A30P/A53T)及び(2)で得られた導入遺伝子マーカーCX-EGFPを、遺伝子混合モル比1:1に調整し、マイクロインジェクション (micro-injection) 法にて、BDF<sub>1</sub>マウス間の自然交配によって得られた受精卵(BDF<sub>2</sub>)の雄性前核に1000コピー共導入後、Jcl:ICR偽妊娠マウス(0.5dpc)の卵管内に移植し作製した。受精卵移植後19.5dpcで妊娠マウスから帝王切開で生存子を摘出または自然出産させ、129匹のF0マウスを得た。なお、トランスジェニックマウス作製の基本操作はMethods in Enzymology Vol 225 "Guide to techniques in mouse development" edited by Paul M. Wassarman, Melvin L. DePamphilis, Academic Press, INC. に準じて実施した。

【0035】得られた129匹のF0マウスのEGFPの発現を365nmの紫外線照射で検討し、緑色蛍光が18匹で確認された。この18匹を含む得られた129匹すべての尾のPCR解析を行った。マウス尾より抽出したゲノムDNAを用い、ヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の塩基配列の一部に基づいたプライマー(フォワード: TGG ATG TAT TCA TGA AAG GA (配列番号8); リバーズ: CCA GTG GCT GCT GCA ATG CTC (配列番号9))、及び、EGFP遺伝子の塩基配列の一部に基づいたプライマー(フォワード: TGG TGA GCA AGG GCG AGG AG (配列番号10); リバーズ: TCG TGC TGC TTC ATG TGG TC (配列番号11))を用いたPCRにて、導入されたヒト $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子とEGFP遺伝子の導入を確認した。PCRは、94℃、1分; 52℃、1分; 72℃、1分を35サイクルの反応条件で行った。



【0036】その結果、蛍光を発していたトランスジェニックマウスは、すべてPCR判定で導入遺伝子が確認された。また、蛍光を発していないマウスは、すべてPCR判定で導入遺伝子が確認されなかった。したがって、蛍光の存在は導入遺伝子の存在を示すことが確認され、さらに緑色蛍光の強度と $\alpha$ -シヌクレインタンパク質の発現の強度が比例すると考えられた。18匹のトランスジェニックマウスが365nmの紫外線照射によって、発現したGFPが励起され、皮膚が緑色の蛍光を発したが、この中で、最も緑色蛍光が強く、ヒト $\alpha$ -シヌクレインタンパク質を最も高発現するトランスジェニックマウス3匹を得た。このうち、さらに、以下の(4)に示す生化学、病理学的検討及び(5)行動実験により、生化学的組織学的に最も高発現で行動障害を発症した1系統SIY8713マウスを選択し、成育した。

#### 【0037】(4) 生化学、病理学的検討

$\alpha$ -シヌクレインタンパク質を最も高発現であった3匹のうちの1系統であるSIY8713マウスについて、抗 $\alpha$ -シヌクレイン抗体を用いた免疫組織化学的検討 (Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 1998 Apr;152(4):879-84.; Shoji M, Harigaya Y, Sasaki A, Ueda K, Ishiguro K, Matsubara E, Watanabe M, Ikeda M, Kanai M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Amari M, Kosaka K, Nakazato Y, Okamoto K, Hirai S. Accumulation of NACP/alpha-synuclein in lewy body disease and multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000 May;68(5):605-8.) を行った。すなわち、抗 $\alpha$ -シヌクレインモノクローナル抗体 (LB509; コスモバイオ社) をABC elite染色マウスキット (フナコシ社) により標識し、マウス脳を4%パラフォルムアルデヒドで8時間固定後、パラフィン包埋し、5mmの切片を作成したマウス脳切片に反応させ、免疫染色を行った。また、チロシンヒドロキシラーゼ抗体及びサブスタンスP抗体を用いて、同様に免疫染色を行った。また、各染色法 (Nissle, HE) で同様に調製した脳切片を染色した。その結果、中脳黒質を含む脳幹、小脳歯状核の諸神経細胞と小脳プルキンエ細胞、大脳皮質神経細胞にヒト $\alpha$ -シヌクレイン発現タンパク質が蓄積し (図2a)、パーキンソン病/DLBにみられるレビー小体が脳幹神経細胞で確認された (図2c, e, f)。さらに、脳幹と大脳皮質にレビー変性神経突起が認められた。チロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase) (図2g) およびサブスタンスP (substance P) (図2i) 免疫染色では神経活性物質の低下が確認され、神経活性物質やドーパミン代謝の異常も認められた。電顕では生後6カ月齢マウスで核内封入体がみられ (図2j)、生後11カ月齢マウスで細胞内封入体が観察された (図2k)。これらの封入体構造はパ

ーキンソン病にみられる所見と一致していた。

#### 【0038】以下、図2に示す結果の説明をする。

- SIY8713系統マウス;  $\alpha$ -シヌクレイン $\alpha$ -シヌクレイン免疫染色 (LB509), x12, 著明な $\alpha$ -シヌクレインの蓄積がSIY8713系統マウスで認められる。
- 非トランスジェニックマウス;  $\alpha$ -シヌクレイン免疫染色 (LB509), x12
- SIY8713系統マウス;  $\alpha$ -シヌクレイン免疫染色 (LB509), x200, 胞体内にレビー小体が観察される。
- 非トランスジェニックマウス;  $\alpha$ -シヌクレイン免疫染色 (LB509), x200
- SIY8713系統マウス; Nissle染色, x100, 胞体内に丸い蓄積物質が確認される。
- SIY8713系統マウス; HE染色, x200, HEでも観察される。
- SIY8713系統マウス; チロシンヒドロキシラーゼ免疫染色, x100, 著明な低下が観察される。
- 非トランスジェニックマウス; チロシンヒドロキシラーゼ免疫染色, x100, i. SIY8713系統マウス; サブスタンスP免疫染色, x100
- 非トランスジェニックマウス; サブスタンスP免疫染色, x100
- SIY8713系統マウス; 電顕所見, x33000, 電顕的にレビー小体が観察される。
- SIY8713系統マウス; 電顕所見, x12000, 核内にも封入体が認められる。

#### 【0039】(5) 行動実験

(4) で得られたSIY8713系統マウスについて、ローターロッドによる行動実験を行った。実験器具は、TRED MILL FOR MICE 7600 (ugo basile, biological research apparatus社, ミラノ, イタリア) を用いた。実験は、16 サイクル/分にてロッドを回転させ、1分間でのマウスの落下時間 (秒) を計測して行った。その結果、4カ月齢トランスジェニックマウスで同年齢の非トランスジェニックマウスに比べて、統計学的に有意な運動機能低下が認められた ( $p < 0.01$ , 図3)。すなわち、SIY8713系統マウスは、行動障害を発症した。

#### 【0040】(6) 脳内カテコールアミンの測定

マウス脳における脳内カテコールアミンの測定を行った。トランスジェニック及び対照 (非トランスジェニック) マウス脳にマイクロウェーブ照射 (9.0 kW, 0.42 秒, NJE 2603, New Japan Radio社, 上福岡, 日本) した後、マウスを解剖し、脳重を測定した。それぞれの脳の部位に分け、1 ml の0.05 M 過塩素酸と10 nmol/10  $\mu$ l のヨウ化エチルホモコリン (ethylhomocholine iodide) を加えて、超音波破碎機 (US-300T, Nissei社, 東京, 日本) で破碎し、17,300 g、4°C、15分で超遠心した。上清を0.45  $\mu$ m のミリポアフィルターを通した後、5  $\mu$ l のサンプルを各種カテコールアミンのelectrochemical detector (LC-ECD社) を装着したHPLCに打ち込



んで各濃度を測定した。遠心した沈殿を、2 ml の1 M NaOH で再度攪拌し、タンパク濃度を決定した (Bio-Rad protein assay kit, Bio-Rad社, Richmond, カリフォルニア, 米国)。その結果、10ヶ月齢SIY8713系統マウスの脳ではドーパミンが線状体で低下していた (図4)。

【0041】 (7) GFPによるトランスジェニックマウスの選択

高発現SIY8713系統マウスに、365nmの紫外線照射し、GFPの蛍光を観察した。その結果、高発現SIY8713系統マウスは同時に導入したGFPによって365nmの紫外線照射によって蛍光を発し、トランスジェニックマウスを容易に選択可能であった。

【0042】

【発明の効果】本発明により、パーキンソン病原因遺伝子である $\alpha$ -シヌクレイン遺伝子の二重変異型遺伝子が導入されている、レビー小体の出現、行動異常及び脳内ドーパミンの低下を再現するパーキンソン病モデルトランスジェニックマウス、同トランスジェニックマウスの効率的な選択方法、及び、同トランスジェニックマウスを用いたパーキンソン病治療薬のスクリーニング方法が提供される。

【0043】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> Mikio SHOJI; Masaki IKEDA; Shuichi YAMADA

<120> パーキンソン病モデルトランスジェニックマウス

<130> P-9422

<160> 11

【0044】

<210> 1

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<223> alpha-synuclein protein

<400> 1

Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val

5

10

15Ala Ala Ala Glu Lys Thr

Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys20

25

30Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val

35

40

45Val His Gly Val Ala Thr Val Al

a Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr50

55

60Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys65

70

75

80Thr Val Glu Gly

Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys

85

90

95

Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile

100

105

110

Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro

115

110

115

Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala

120

125

130

【0045】

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 2

aaccatgaac ctg

【0046】

<210> 3

15

16

<211> 13  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 3  
aagcttctag atc

13

【0047】

<210> 4  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 4  
tgtggcagaa gcaccagga

19

【0048】

<210> 5  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 5  
tcctggtgct tctgccaca

19

【0049】

<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 6  
tggtgtgaca acagtggct

19

【0050】

<210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 7  
agccactggt gtcacacca

19

【0051】

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>

17

18

<223> PCR primer  
<400> 8  
tggatgtatt catgaaagga

20

【0052】

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 9  
ccagtggctg ctgcaatgct c

21

【0053】

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 10  
tggtagcaa gggcgaggag

20

【0054】

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> PCR primer  
<400> 11  
tcgtgctgct tcatgtggtc

20

【0055】

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、導入遺伝子コンストラクトを示す図である。

【図2】 図2は、SIY8713系統マウスの免疫染色を示す図（写真）である。

【図3】 図3は、ローターロッド試験の結果を示す図である。

【図4】 図4は、大脳カテコールアミンの変化を示す図である。

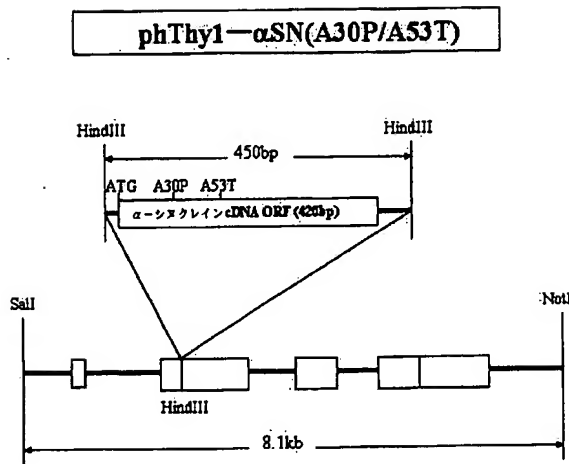
DA: ドーパミン(Dopamine)、NE: ノルエピネフリン(Nor epinephrine)、5HT: セロトニン(Serotonin)、Ach: アセチルコリン(Acetylcholine)

CN: 対照大脳皮質(control cerebral cortex)、CT: トランスジェニックマウス大脳皮質(transgenic mice cerebral cortex)、HN: 対照海馬(control hippocampus)、

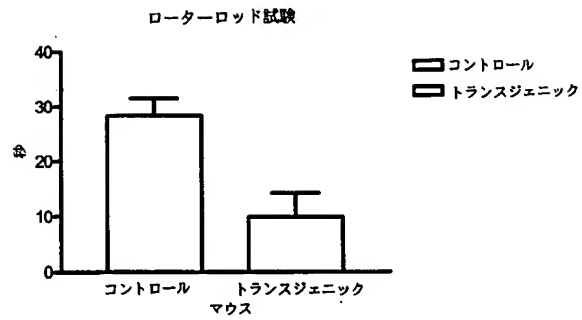
HT: トランスジェニックマウス海馬(transgenic mice hippocampus)、MTN: 対照中脳視床(control midbrain-thalamus)、MTT: トランスジェニックマウス中脳視床(transgenic mice midbrain-thalamus)、SN: 対照線条体(control striatum)、ST: トランスジェニックマウス線条体(transgenic mice striatum)、HyN: 対照視床下部(control hypothalamus)、HyT: トランスジェニックマウス視床下部(transgenic mice hypothalamus)、MPN: 対照橋延髄(control medulla-pons)、MPT: トランスジェニックマウス橋延髄(transgenic mice medulla-pons)、CeN: 対照小脳(control cerebellum)、CeT: トランスジェニックマウス小脳(transgenic mice cerebellum)、WN: 対照全脳(control whole brain)、WT: トランスジェニックマウス全脳(transgenic mice whole brain)。

【図5】 図5は、ヒトThy-1遺伝子の変異配列を示す図である。

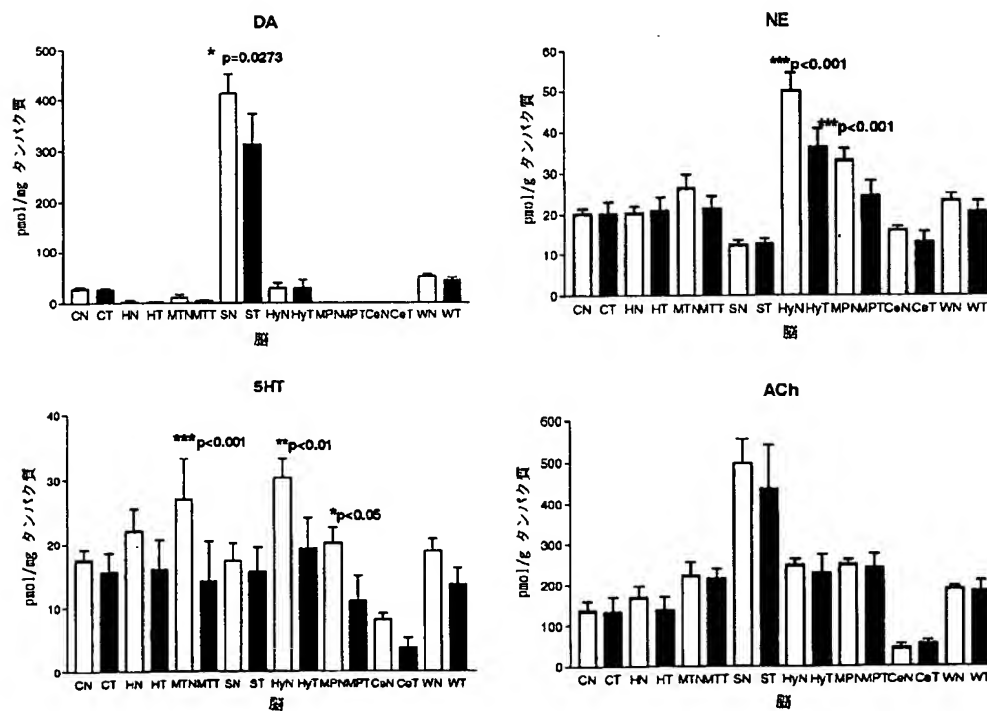
【図1】



【図3】



【図4】

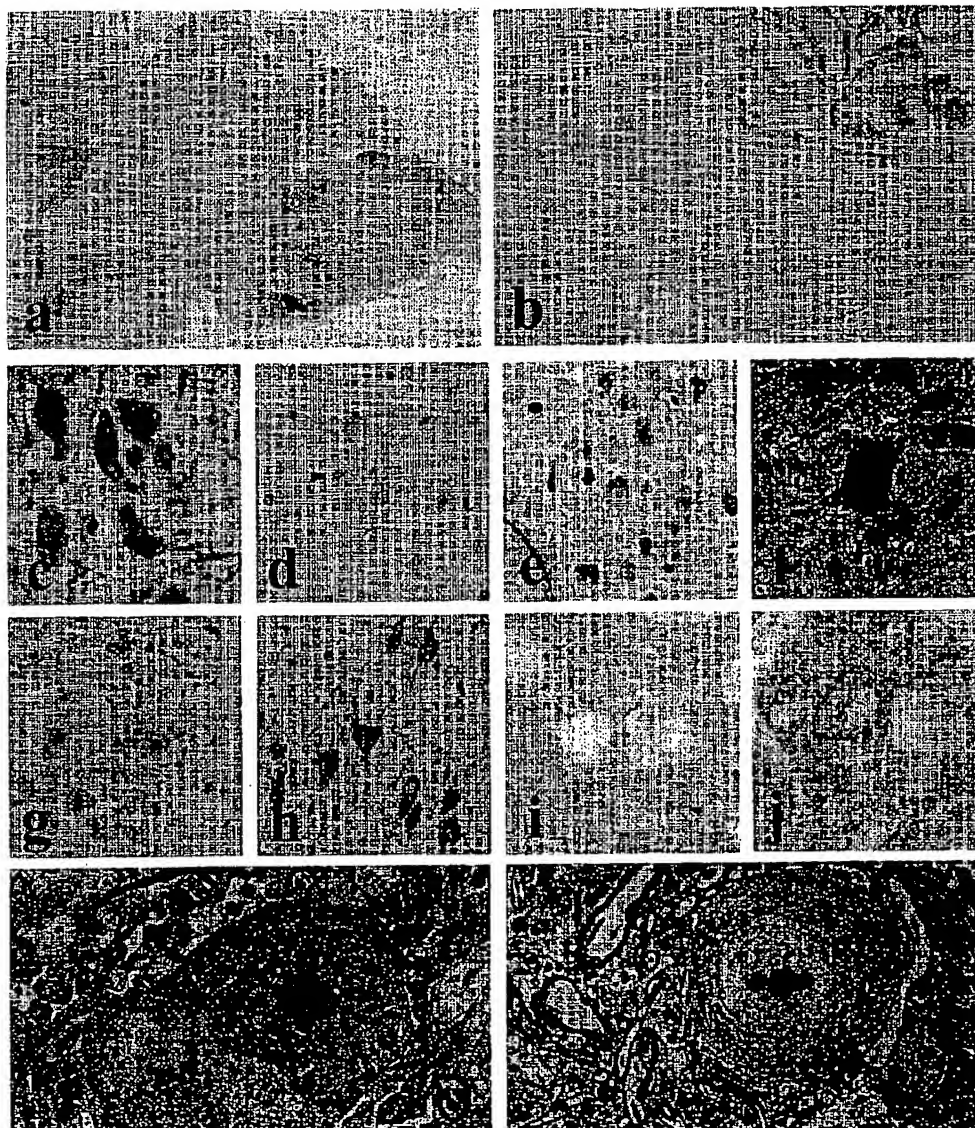


【図5】

(ATG は開始コドン)

正常配列: AACCA7GACCTG (配列番号2) → 変異配列: AAGCTCTAGATC (配列番号3)

【図2】



フロントページの続き

(72)発明者 東海林 幹夫  
岡山市門田屋敷2-2-1  
(72)発明者 池田 将樹  
前橋市上小出1-23-9

(72)発明者 山田 秀一  
京都市左京区聖護院川原町53  
Fターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB10 CB17  
DA13 DA36 FB02  
4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 FA02  
FA10 GA12 HA17